

- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 8855—2008 新鲜水果和蔬菜取样方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [16] 中华人民共和国农业部. NY/T 789—2004 农药残留分析样品的采样方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [17] Kumar P, Rubies A, Centrich F, et al. Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometry; applic 45 ation to determination of synthetic hormones in animal urine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 780(1): 65-73.
- [18] Fernich A G, Romero-González R, Gómez-Pérez M L, et al. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(28): 4349-4356.

实验技术与方法

实时荧光定量 PCR 法与分离培养法检测食品从业人员沙门菌和志贺菌的比较研究

韩毅, 孙燕萍, 周虹, 毛菲菲

(无锡市疾病预防控制中心, 江苏 无锡 214023)

摘要:目的 比较实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)与分离培养法对食品从业人员肠道致病菌沙门菌和志贺菌的检测效果。方法 ①RT-PCR 法:用实时荧光定量 PCR 对体检肛拭子进行初筛;②分离培养法:按照国标方法 GB/T 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》和 GB/T 4789.5—2003《食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验》对所筛选出的菌株进行鉴定。结果 RT-PCR 法对食品从业人员肠道沙门菌和志贺菌的检出率明显高于分离培养法。结论 RT-PCR 法相对于分离培养法在从业人员体检沙门菌和志贺菌的检测中,无论从检出率、准确度,还是检测时效性上都有着明显的优势。因此,在从业人员体检中运用 RT-PCR 法具有很好的实际意义。

关键词:沙门菌;志贺菌;实时荧光定量 PCR 法;分离培养法;比较;食源性致病菌

中图分类号:R155; R378; R378.2⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)02-0132-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.02.008

Comparison of RT-PCR method and culture method for the detection *Salmonella* and *Shigella* from food practitioners

HAN Yi, SUN Yan-ping, ZHOU Hong, MAO Fei-fei

(Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Wuxi 214023, China)

Abstract: Objective To compare the effect of RT-PCR and isolated culture for the detection of food practitioners of *Salmonella* and *Shigella*. **Methods** ① RT-PCR, ② isolated culture. **Results** The detection rate of RT-PCR was significantly higher than that in isolated culture for food practitioners intestinal *Salmonella* and *Shigella*. **Conclusion** RT-PCR method was superior to the isolation and culture method in the detection of practitioners physical examination of *Salmonella* and *Shigella* in terms of detection rate, accuracy and timeliness. Therefore, the use of RT-PCR in the physical examination of employees has very important practical application value.

Key words: *Salmonella*; *Shigella*; real-time PCR; isolated culture; compare; foodborne pathogens

根据我国相关法律法规的要求,食品从业人员不能携带有伤寒、副伤寒和痢疾病原菌,否则将不能取得健康证和在该领域从业。但是引起人群感染和腹泻的往往是其他血清型的沙门菌和志贺菌。

因此对从业人员体检中的沙门菌和志贺菌加强监测和管理很有必要。

目前,在我国绝大多数地区,传统的分离培养方法仍是检测沙门菌和志贺菌的主要方法,此方法检测时限长、工作量大、灵敏度低,远不能满足大批量食品从业人员体检的要求。

利用实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-

收稿日期:2014-08-05

作者简介:韩毅 男 主管实验师 研究方向为细菌检测及研究

E-mail:154076177@qq.com

PCR)检测沙门菌和志贺菌虽已有大量应用,国内外也有很多相关报道。如 Whitcombe 等^[1]应用美国食品与药品管理局(FDA)推荐的荧光 PCR 试剂用于检测沙门菌,Vu 等^[2]于 2004 年应用 PCR 方法检测了志贺菌,石晓路等^[3]建立了多重实时 PCR 同时快速检测沙门菌和志贺菌的方法。但目前 RT-PCR 在食品从业人员体检监测中很少运用。本研究针对沙门菌 *ssaR* 基因和志贺菌 *IpaH* 基因设计引物和分子信标探针,建立含有沙门菌和志贺菌的实时荧光定量 PCR 体系,用此方法对体检肛拭子进行 PCR 初筛。由于任何病原菌的检测报告均要以检出活菌为依据,因此本研究将传统培养法作为验证,对 2013 年全年共 72 379 份试验样品同时用 RT-PCR 法与分离培养法检测并比较其结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

采集无锡市疾病预防控制中心从业人员体检门诊肛拭子,2013 年全年 72 379 份。

1.1.2 主要仪器与试剂

Real-Time PCR 仪(ABI 7500 FAST,美国 ABI)、VITEK2 全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃)、恒温混匀仪、生物安全柜、高速冷冻离心机。

沙门菌-志贺菌增菌液、缓冲蛋白胨水(BPW)、四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、亚硫酸铋(BS)琼脂、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、三糖铁(TSI)琼脂、SS 琼脂、麦康凯琼脂、微量生化反应套装均购自杭州微生物制剂有限公司。

沙门菌 O 和 H 诊断血清、志贺菌属诊断血清均购自宁波天润生物药业有限公司。应用 PRIMER 软件设计沙门菌 *ssaR* 基因和志贺菌 *IpaH* 基因的引物和分子信标探针,包括 Buffer、*Taq* 酶、dNTP、 Mg^{2+} 、引物和探针均由江苏硕世生物科技有限公司与本课题组合作合成,此方法的最低检出量为沙门菌 500 cfu,志贺菌 500 cfu。

1.2 方法

1.2.1 采样方法

采用特定的玻璃肛拭子插入肛齿线内 3 cm,轻旋 3 周后取出待检。

1.2.2 分离培养法

按 GB/T 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[4]和 GB/T 4789.5—2003《食品卫生微生物学检验 志贺菌检验》^[5],采集的肛拭子置入沙门菌-志贺菌增菌液增

菌 18~24 h,划线接种到 SS 琼脂、XLD 琼脂,进行平板分离,将可疑菌落接种到 TSI 分纯,将符合 TSI 管产酸产气的菌落再进行 VITEK2 全自动细菌鉴定仪鉴定及血清凝集。

1.2.3 RT-PCR 法

将待检肛拭子置于沙门菌-志贺菌增菌液增菌 3~5 h,用一次性滴管吸取 2 滴(大约 50 μ l)增菌液置于 1.5 ml 无菌离心管中,按此方法收集 20 人份的肛拭子增菌液置于同一个 1.5 ml 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 3 min 后弃掉上清,保留沉淀;每管沉淀溶于 50 μ l DNA 提取液,将沉淀悬浮后于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,10 000 r/min 离心 3 min,取 5 μ l 上清液用于 PCR 反应。用 ABI 7500 FAST 型 Real-Time PCR 仪进行扩增,反应体系为 25 μ l,检测通道:沙门菌选择 FAM,志贺菌选择 VIC(HEX),循环参数见表 1。PCR 初筛出的阴性结果直接报告为阴性;阳性结果则将对应的 20 份肛拭子增菌液继续单独培养 18~24 h,再根据分离培养法给予最终确证。

表 1 RT-PCR 核酸扩增相关参数

Table 1 Nucleic acid amplification parameters

步骤	温度/ $^{\circ}$ C	时间	循环数
尿嘧啶糖苷酶处理	37	5 min	1
预变性	95	5 min	1
变性	95	10 s	
退火、延伸及检测荧光	55	40 s	40

1.2.4 质量控制

采样人员、检测人员由无锡市疾病预防控制中心质管部及硕世公司进行培训;所有的采样工具、检测耗材均在灭菌后或无菌情况下使用;增菌液、培养基、生化试剂、血清、VITEK2 GN 卡均用标准菌株[沙门菌(ATCC 50013)、志贺菌(ATCC 51302)]进行验收;每批 PCR 试剂用试剂盒自带的 PCR 阳性对照荧光值和 CT 值进行验收;在实际使用 RT-PCR 法之前,挑取无锡市疾病预防控制中心菌种库保存的不同血清型沙门菌 10 株、志贺菌 10 株,各挑选 1 株与已确证为阴性的肛拭子样品混合,按 RT-PCR 法的步骤进行检测并验证,结果见表 2。

1.3 统计学分析

利用软件 SPSS 18 进行统计学处理,应用配对计数资料的卡方检验比较两种方法的差异性,结果显示 P 值均 <0.01 ,表明 PCR 和传统培养法差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法结果比较

2013 年全年 72 379 份试验样品,分离培养法

表2 10株混合沙门菌、志贺菌的阴性肛拭子检测结果

Table 2 Detection results of 10 strains of anal swab

菌株	菌株编号	检测结果			菌株	菌株编号	检测结果		
		血清型	PCR 结果	生化验证			血清型	PCR 结果	生化验证
沙门菌	WXCDC. SM. 013	德比	+	符合	志贺菌	WXCDC. SH. 002	福氏 2a	+	符合
	WXCDC. SM. 014	伦敦	+	符合		WXCDC. SH. 003	福氏 2a	+	符合
	WXCDC. SM. 022	德尔卑	+	符合		WXCDC. SH. 006	福氏 1a	+	符合
	WXCDC. SM. 027	伤寒	+	符合		WXCDC. SH. 007	福氏 3a	+	符合
	WXCDC. SM. 032	鼠伤寒	+	符合		WXCDC. SH. 008	宋内 1 相	+	符合
	WXCDC. SM. 036	婴儿	+	符合		WXCDC. SH. 012	福氏 2b	+	符合
	WXCDC. SM. 038	布利丹	+	符合		WXCDC. SH. 019	宋内 2 相	+	符合
	WXCDC. SM. 041	山夫登堡	+	符合		WXCDC. SH. 039	福氏 5a	+	符合
	WXCDC. SM. 042	火鸡	+	符合		WXCDC. SH. 047	宋内 2 相	+	符合
	WXCDC. SM. 049	肠炎	+	符合		WXCDC. SH. 063	福氏 1b	+	符合

检测出沙门菌 56 份,检出率为 0.077 4%,志贺菌 2 份,检出率为 0.002 76%。RT-PCR 法结果:沙门菌 PCR 初筛阳性 277 份,检出率为 0.3827%,分离培养法最终验证沙门菌为 136 份;志贺菌 PCR 初筛阳性 12 份,检出率 0.016 6%,分离培养法最终验证志贺菌为 5 份,具体见表 3。

表3 两种方法的结果比较

Table 3 Comparison of two kinds of results

方法	样品数 /份	沙门菌			志贺菌		
		PRC 初筛阳 性数 /份	分离培 养符 合数 /份	符合 情况 /%	PRC 初筛阳 性数 /份	分离培 养符 合数 /份	符合 情况 /%
RT-PCR 法	72 379	277	136	49.10	12	5	41.67
单独分离培养法	72 379	—	56	—	—	2	—

注:—为无数据

2.2 PCR 法的真实性指标评价^[6]

灵敏度指标反映方案对于阳性样品的符合情况,特异度指标反映方案对于阴性样品的符合情况。假阴性率反应的是筛检试验漏检的情况,假阳性率反应的是实际为阴性,但根据筛检试验被判为阳性的百分比。沙门菌的灵敏度为 100%,特异度为 99.8%,假阴性率为 0,假阳性率为 0.195%。志贺菌的灵敏度为 100%,特异度为 99.99%,假阴性率为 0,假阳性率为 0.009 67%,两种菌的情况分别见表 4、5。

表4 沙门菌的灵敏度和特异度验证表(份)

Table 4 Sensitivity and specificity of *Salmonella* verification

RT-PCR 法	分离培养法		小计
	阳性	阴性	
阳性	136 ^a	141 ^b	277
阴性	0 ^c	72 102 ^d	72 102
合计	136	72 243	72 379

注:a、b、c、d 为公式中数值;灵敏度 = $a/(a+c) \times 100\%$;特异度 = $d/(b+d) \times 100\%$;假阴性率 = $c/(a+c) \times 100\%$;假阳性率 = $b/(b+d) \times 100\%$

3 讨论

从结果可以看出,由于 RT-PCR 法利用了自身高灵敏度和快速的特点,并结合了分离培养法这个

表5 志贺菌的灵敏度和特异度验证表

Table 5 Sensitivity and specificity of *Shigella* verification

RT-PCR 法	分离培养法		小计
	阳性	阴性	
阳性	5 ^a	7 ^b	12
阴性	0 ^c	72 367 ^d	72 367
合计	5	72 374	72 379

注:a、b、c、d 为公式中数值;灵敏度 = $a/(a+c) \times 100\%$;特异度 = $d/(b+d) \times 100\%$;假阴性率 = $c/(a+c) \times 100\%$;假阳性率 = $b/(b+d) \times 100\%$

细菌检测的金标准,沙门菌和志贺菌的检出率明显高于单独的分离培养法,且检出的沙门菌和志贺菌阳性样品与分离培养法比较,无一漏检,这充分体现了 RT-PCR 法的高效性和准确性。和沙门菌相比,无论是否采用 RT-PCR 法,志贺菌的检出数量明显要少的多,这可能是因为志贺菌在本地区为非优势致病菌,也可能提示本研究的检测方法还有待进一步改进。

以往的从业人员体检沙门菌和志贺菌的检出率都非常低,是因为传统的分离培养方法对大批量的从业人员进行沙门菌和志贺菌检测时,操作过程繁琐、工作量大,且对检测人员的操作态度、操作经验有着很高的要求。传统的分离培养法往往由于检测人员在某一环节的疏忽,导致漏检,比如由于样品数量过大,检测人员在试验过程中需长时间保持高度注意力来观察每一块平板上的菌落形态,一是容易将非典型形态的菌落漏过,二也容易使人疲劳。更因为一些地区没有现代化的细菌鉴定仪器,还使用微量生化管鉴定套装加上血清凝集,这样的配置虽然经典,但很多时候会导致一些有结果争议的样品无法以阳性结果报告。如果有了 PCR 的筛检,在最终的结果报告时又能多了一份把握。且由于 RT-PCR 的高灵敏度特点,漏检的概率将会大大降低。

本实验室经过一年的 RT-PCR 法实践,将 RT-PCR 和分离培养法结合起来,不仅灵敏度和特异度高,而且检测时间快。分离培养法一份阳性样品的

报告检出,需要增菌、划线接种、观察筛选、初步生化、转纯、生化鉴定、血清鉴定等步骤,一个周期下来,大约要 5~6 d 的时间。而一个能够熟练掌握核酸提取和运用 RT-PCR 检测的人员,做 300 份左右的样品得出初筛结果大概只需 3 h 左右。虽然阳性初筛样品还需要分离培养法来验证,但这样已经节省了绝大多数样品需要划线接种等常规分离步骤的时间。将 PCR 初筛结果为阴性的直接略过,使得检测目标更明确,针对性更强。

从经济角度来考虑,虽然使用成品的 PCR 试剂盒、离心管、移液器枪头等耗材都较贵,但将 20 人份的样品做为一个上机的 PCR 样品,可以节省一大批耗材及试剂盒中的提取液、反应液、酶以及单独分离培养法需要的选择性琼脂平皿等。用 RT-PCR 法筛查每人份的成本大约为 4 元,分离培养法的成本大约为 3.2 元。将 RT-PCR 法和单独分离培养法比较的话,两者的成本趋于接近,RT-PCR 法略高一些。很多单位应该都能够接受。是否能够将更多人份的样品做为一个上机的 PCR 样品,要根据试剂盒的情况而定,有试验曾将 40 份样品做为的一组^[7],如果不影响初筛结果的话,那无疑有着更好的经济性。

RT-PCR 法虽有诸多优点,但是 PCR 初筛形成的一部分假阳性结果也是不可忽视的。表 3 中 RT-PCR 法检测出的两种菌的数量与分离培养法最终验证的数量是具有一定差异的,本研究曾将几个批次有上述情况的体检样品进行 RT-PCR 法和分离培养法的复测,前后 RT-PCR 法结果不一致,证明 RT-PCR 法确实有假阳性的可能。有可能是样品混合的多,干扰成分十分复杂,导致假阳性的发生。可以通过减少样品的混合数量或经过一定的筛选处理减少此类情况发生。还有一个原因可能是一部分带菌者服用了抗生素或其他抑菌剂而导致样

品中含有大量死亡菌体,此时可能出现 PCR 阳性而培养法阴性的结果^[8]。遇到这样的情况,本课题组的经验是可以继续培养一段时间后,通过 PCR 的定量测验,来观察该样品的 CT 值,若无明显变化,则可验证此一假设。

随着食品从业人员人数逐年增加,健康体检机构的压力加大。检测技术的快速化、自动化和准确化已成为目前方法改进的最大需求。RT-PCR 法从国情出发,充分体现了实用性、准确性和经济性的要求,值得在各类健康体检机构中推行。

参考文献

- [1] Whitcombe D, Theaker J, Guy S P, et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(8): 804-807.
- [2] Vu D T, Sethabutr O, Von Seidlein L, et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 2031-2035.
- [3] 石晓路,扈庆华,张佳峰,等.多重实时 PCR 快速同时检测沙门氏菌和志贺氏菌[J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(12): 1053-1056.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- [5] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789. 5—2003 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [6] 李立明,叶冬青,詹思延. 流行病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2007:170-171.
- [7] 褚国方,张月娟,李明珠,等. Real-Time PCR 技术与传统培养法检测肠道沙门菌和志贺菌的比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(8): 1458-1460.
- [8] 邱亚群,扈庆华,汪武新,等. 荧光 PCR 对从业人员肠道致病菌筛查的评价[J]. *中国热带医学杂志*, 2009, 9(1): 12-13.

· 标准工作动态 ·

美国批准在糖果类食品中使用色素氧化铁

2015 年 3 月 27 日美国 FDA 发布 G/SPS/N/USA/2747 号通报,允许在糖果、薄荷和口香糖中使用人工合成色素氧化铁。(来源:国家质检总局)

(相关链接:http://www.aqsig.gov.cn/xxgk_13386/zxxxgk/201503/t20150331_435493.htm)